ChinaXiv合作期刊

干扰 PKM2 对人白血病细胞增殖和凋亡的影响及潜在机制

汪路 杨丽媛 唐雨婷 陶瑶 雷力 敬一佩 蒋雪珂 张伶*

（重庆医科大学检验医学院 临床检验诊断学教育部重点实验室 重庆市重点实验室 重庆 400016）

摘要 目的：本文旨在探讨糖酵解酶丙酮酸激酶 M2 型（PKM2）对人白血病细胞体外增殖和凋亡的影响及潜在机制。**方法：**将靶向 PKM2 的慢病毒载体转染人 K562 细胞株（shPKM2 组），同时设立空载体转染组为对照（Vector 组）。采用 qRT-PCR 和 Western blot 技术分别检测 Vector 组和 shPKM2 组 PKM2 mRNA 和蛋白的表达以及自噬标志物的变化；CCK-8 实验检测细胞体外增殖能力；流式细胞术检测细胞周期和凋亡情况；Western blot 检测凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 表达水平。**结果：**在稳定干扰 PKM2 后，PKM2 的 mRNA（t=11.58，P=0.0003）和蛋白水平（t=11.88，P=0.0003）均明显降低。与 Vector 组比较，shPKM2 组细胞体外增殖能力显著降低（F=118.87，P＜0.0001）。同时，干扰 PKM2 可使 K562 细胞周期阻滞在 G_1 期，细胞凋亡率显著增加（t=37.23，P＜0.0001）；使促凋亡蛋白 Bax 表达增加（t=15.36，P=0.0001）、抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达降低（t=9.965，P=0.0006）。此外，干扰 PKM2 可减弱 K562 细胞自噬水平，表现为 LC3II 降低（t_{LC3II}=10.32，P_{LC3II}=0.0005），而 p62 水平增加（t_{p62}=14.59，P_{p62}=0.0001）。还发现自噬诱导剂能逆转 shPKM2 引起的白血病细胞体外增殖能力减弱（F=96.32，P＜0.0001）。**结论：**以上结果表明干扰 PKM2 可抑制人白血病 K562 细胞的体外增殖并促进其凋亡，其机制可能与 PKM2 介导的自噬活性降低有关，提示 PKM2 可能作为白血病诊疗的一个潜在靶点。

关键词：PKM2；白血病；增殖；凋亡；自噬

国家自然科学基金面上项目(批准号：81873937)、重庆市渝中区科技计划项目（批准号：20170411）和重庆市研究生科研创新项目(批准号：CYS17155)资助的课题

*通讯作者，Tel：023-68485240，电子邮箱：lingzhang@cqmu.edu.cn

chinaXiv:201811.00118v1

ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:201811.00118v1

Effects of PKM2 Knockdown on Proliferation and Apoptosis of Human Leukemia Cells and Its Potential Mechanism

WANG Lu, YANG Li-yuan, TANG Yu-ting, TAO Yao, LEI Li, JING Yi-pei, JIANG Xue-ke, ZHANG Ling*

(College of Laboratory Medicine, Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics Designated by the Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract Objective: Effects of PKM2 knockdown on proliferation and apoptosis of human leukemia cells and its potential mechanism were investigated in our experiment. **Methods:** Lentivirus-based short hairpin RNA (shRNA) vector targeting PKM2 was transfected into K562 cells (shPKM2 group), and the vector-treated cells were named as the Vector group. mRNA and protein levels of PKM2 in K562 cells were determined by qRT-PCR and Western blot techniques, respectively. Cell proliferation activity was evaluated by CCK-8 assay *in vitro*. Cell cycle and apoptosis rate were analyzed by flow cytometry, the expression levels of apoptosis-related proteins Bax and Bcl-2 were measured by Western blot and the autophagy activity was measured by qRT-PCR and Western blot, respectively. **Results:** mRNA (t=11.58, P=0.0003) and protein (t=11.88, P=0.0003**)** levels of PKM2 were significantly decreased after PKM2 knockdown in K562 cells. In comparison to the Vector group, cell proliferation was inhibited by PKM2 deleption in shPKM2 group **(**F=118.87, P<0.0001**).** Furthermore, G_1-phase cell cycle was arrested, and the cell apoptosis rate was increased after PKM2 knockdown (t=37.23, P<0.0001). Meanwhile, upregulated pro-apoptotic Bax protein levels (t=15.3, P=0.0001) and downregulated anti-apoptotic Bcl-2 protein levels (t=9.965, P=0.0006) were observed in shPKM2 group compared with the Vector group. In addition, decreased expression of PKM2 significantly downregulated LC3II levels (t_{LC3II}=10.32, P_{LC3II}=0.0005) and elevated p62 levels (t_{p62}=14.59, P_{p62}=0.0001) in K562 cells. Finally, autophagy activator rapamycin rescued the inhibitory cell proliferation due to PKM2

This work was supported by NSFC (Grant No.81873937), Natural Science Foundation of Chongqing Yuzhong District (Grant no. 20170411) and the Graduate Fellowship in Research Innovation from the Chongqing Municipal Education Commission (Grant No.CYS17155)

*Corresponding author, Tel: +86-23-68485240, E-mail: lingzhang@cqmu.edu.cn

knockdown (F=96.32, P＜0.0001). **Conclusion:** Above-mentioned results indicate that PKM2 knockdown can inhibit cell proliferation and promote cell apoptosis, at least partially through the cell autophagy, and PKM2 might be a potential target in the treatment of leukemia.

Key words: PKM2; leukemia; proliferation; apoptosis; autophagy

chinaXiv:201811.00118v1

白血病是一种严重威胁人类健康的造血干细胞恶性增殖性疾病，其发病率和死亡率较高，5年存活率低于50%[1]。目前临床上主要通过化疗及造血干细胞移植进行治疗，这些疗法在一部分白血病患者中有较好的疗效，但大多数患者的不良反应和复发率比较高，因此寻找白血病治疗的相关靶向作用分子，是改善此病治疗现状的有效途径。糖代谢是细胞代谢的重要供能途径之一，丙酮酸激酶（Pyruvate kinase，PK）作为糖代谢过程中的关键限速酶，能催化磷酸烯醇式丙酮酸生成丙酮酸[2]，而PKM2（Pyruvate kinase isoenzyme M2，PKM2）是PK的一个M2亚型[3]。已经证实除了其在糖酵解过程中的经典作用之外，PKM2能作为促肿瘤因子调控肿瘤的发生发展[4]。目前PKM2在白血病细胞中的非代谢促癌分子机制尚不清楚，近年来自噬在白血病中的作用逐渐得到关注[5]。为探讨自噬是否参与了PKM2介导的促白血病作用，本实验观察干扰PKM2对K562白血病细胞体外增殖和凋亡的影响，为研究PKM2在白血病发生发展中的作用及靶向治疗研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系

人白血病细胞株K562 购于中科院上海生命科学研究院细胞资源中心，由重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室常规保存。

1.1.2 主要试剂

RPMI 1640 培养基和胎牛血清 FBS 购于美国 Gibco 公司。慢病毒转染试剂以及靶向 PKM2 基因的 shRNA 慢病毒载体和靶向无关序列的空载对照慢病毒载体均由上海吉凯制药技术有限公司构建。青霉素和链霉素、异丙醇、氯仿、上样缓冲液、脱脂奶粉、DEPC 水、磷酸盐缓冲液（PBS）、蛋白裂解液 RIPA 及 BCA 蛋白定量检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司。RNA 提取试剂 TRIzol、RT-PCR 试剂盒购于日本 TaKaRa 公司。引物由上海英骏公司合成。SYBR 快速荧

光定量 PCR 试剂盒购于 KAPA Biosystems 公司。兔抗人 PKM2、LC3、p62 单克隆抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司，兔抗人β-actin 多克隆抗体购于美国 Proteintech 公司，兔抗人 Bax 和 Bcl-2 均为多克隆抗体购于美国 Santa Cruz 公司，对应山羊抗兔 IgG 二抗购于美国 Proteintech 公司。ECL 发光试剂盒和 PVDF 膜购于美国 Millipore 公司。自噬诱导剂 Rapamycin 购于美国 Selleck 公司。CCK-8 试剂盒由日本 Dojindo 公司购得。细胞周期试剂盒和细胞凋亡试剂盒购于美国赛默飞公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人白血病细胞株 K562 在 RPMI 1640 培养基中常规培养，添加 10%胎牛血清和 1%青霉素和链霉素，并于 37℃、5% CO2 的培养箱中进行培养，当培养至对数生长期时收集细胞用于后续的实验。

1.2.2 慢病毒干扰载体的构建及包装 取对数生长期的细胞接种于6孔板中，待细胞生长密度至80%时，采用polybrane进行干扰慢病毒转染，具体步骤依照慢病毒转染试剂盒说明书进行，待细胞转染48 h后，于倒置光学显微镜下观察细胞形态学的变化，随后收集细胞用于后续实验。携带靶向PKM2基因的shRNA慢病毒载体(PKM2-shRNA，5'- CATCTACCACTTGCAATTA -3')和靶向无关序列的空载对照慢病毒载体均由上海吉凯制药技术有限公司合成并包装，并进行测序鉴定和病毒滴度的测定。

1.2.3 qRT-PCR检测mRNA表达水平 细胞培养48 h后，转移至提前预冷的1.5 mL无RNA酶EP管中，置于冰上，加入PBS离心洗涤3次，每次2000 r/min离心2 min；用TRIzol试剂抽提细胞总RNA，加入1/5体积的氯仿，12000 r/min离心15 min，吸取上清，加入等体积的异丙醇，12000 r/min离心10 min。弃上清，加入75%酒精清洗2次，每次12000 r/min离心5 min，吸去上清液，37 ℃放置5 min，使乙醇挥发，加入10 μL DEPC水，溶解沉淀。检测浓度后用RT-PCR逆转录成cDNA。以β-actin作为内参，qRT-PCR扩增细胞中靶基因的表达，用于qRT-PCR反应的引物序列见表1。扩增反应条件：94℃ 5 min，94℃ 30 s，60℃ 30 s，72℃ 50 s，循环39次；72℃ 10 min。实验独立重复3次。相对定量值结果用$2^{-\Delta\Delta Ct}$计算。

chinaXiv:201811.00118v1

表1. 定量PCR所用引物序列

Table 1. The qRT-PCR primer sequences for each gene

基因Genes	**序列Sequences(5' - 3')**
PKM2	F： 5'-GCCTGCTGTGTCGGAGAAG-3'
	R： 5'-CAGATGCCTTGCGGATGAATG-3'
LC3	F： 5'-GACCGCTGTAAGGAGGTGC-3'
	R： 5'-CTTGACCAACTCGCTCATGTTA-3'
p62	F： 5'-GGGGACTTGGTTGCCTTTT-3'
	R： 5'-CAGCCATCGCAGATCACATT-3'
β-actin	F： 5'-TAGTTGCGTTACACCCTTTCTTG-3'
	R： 5'-TGCTGTCACCTTCACCGTTC-3'

缩写：F代表前向；R代表反向

Abbreviations: F stands for forward; R stands for reverse

1.2.4 Western blot检测蛋白表达水平 收集各组细胞，预冷的PBS洗涤3次，每次以2000 r/min离心2 min，留取细胞沉淀备用。使用预冷PBS清洗细胞后，通过加入适量RIPA蛋白裂解液提取总蛋白，以13000r/min离心40 min，取上清， BCA

41: 5 min 40 μg/ 的12% SDS-PAGE胶中，以浓缩胶80 V恒压分离30 min、分离胶120 V恒压分离90 min电泳分离蛋白。然后通过湿转仪210 mA恒流电转1 h将蛋白转移至PVDF膜。室温下用5%脱脂奶粉封闭3 h后，分别加入一定稀释比例的抗PKM2、Bax、Bcl-2、LC3、p62、β-actin抗体，4°C孵育过夜。次日用TBST洗膜2次，TBS洗膜1次，每次10 min摇床振摇洗涤，洗膜完成后，在室温下孵育与一抗对应种属的HRP二抗1 h，重复以上洗膜步骤，将条带上覆盖ECL发光液于暗室通过Millipore化学发光系统检测靶蛋白。以β-actin为内参，Western blot条带用Quantity One软件进行统计分析。

1.2.5 CCK-8检测细胞增殖 将空载对照组(Vector)、干扰组(shPKM2)及自噬诱导剂Rapamycin（终浓度为5 μM）各处理组细胞以1×10^3/孔分别接种于96孔板中，每组设置5个复孔，每孔细胞悬液量为100 μL。培养至第0、12、24、36、48、60 h，各加入CCK-8试剂10 μL，37 °C、5% CO2避光培养3 h，酶标仪450 nm波长测其吸光度(*D*)值，得到0、12、24、36、48、60 h的OD_{450}值。以培养时间为横坐标，OD_{450}值为纵坐标，绘制细胞生长曲线。实验独立重复3次。

chinaXiv:201811.00118v1

1.2.6 流式细胞术（FCM）分析细胞周期 流式细胞术检测干扰*PKM2*基因后K562细胞周期的变化。具体操作步骤按如下方法进行：收集shPKM2组、Vector组的K562细胞，1000 r/min离心5 min，弃上清，使用预冷的PBS洗涤2次；离心后弃上清，边振荡边滴入预冷的75%乙醇重悬，–20 °C固定过夜。使用PBS重复洗涤并离心收集细胞，再以预冷的1 mL PBS使细胞重悬，各组样品分别加入190 mL EDTA和10 mL RNase A(10 mg/mL)，室温反应5 min，再加入PI染液，置于4 °C避光反应10 min后加到上样管。上机检测细胞周期各阶段的细胞数，结果采用细胞周期拟合软件ModFit分析，计算各周期所占比例。实验独立重复3次。

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡 收集各组细胞，1000 r/min离心5 min，弃上清，PBS洗涤3次。用500 μL PBS重悬细胞，按细胞凋亡试剂盒说明书操作。细胞悬浮后加入Annexin V-FITC/PI双标记，流式细胞术检测细胞凋亡。Annexin V-FITC(+)/PI(–)表示早期凋亡细胞，Annexin V-FITC(+)/PI(+)表示晚期凋亡细胞，Annexin V-FITC(–)/PI(–)表示活细胞，Annexin V-FITC(–)/PI(+)表示坏死细胞。用早期和晚期凋亡细胞计算细胞凋亡率。细胞凋亡率(%)=凋亡细胞数/总细胞数×100%。实验独立重复3次。

1.2.8 统计学分析 采用SPSS 22.0软件对实验结果进行统计分析。每组数据来自3次独立的实验，定量资料以均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，两样本均数比较采用*t*检验，CCK-8实验结果采用两因素重复方差分析（Two-way Repeated Measures Anova）。检验水准为α=0.05。*P*<0.05示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白血病 K562 细胞中干扰 PKM2 的表达

qRT-PCR结果显示，与Vector组相比，shPKM2组中*PKM2* mRNA相对水平显著降低，差异有统计学意义（*t*=11.58，*P*=0.0003）（图1a）。Western blot结果显示，shPKM2组中PKM2蛋白条带灰度值较Vector组明显减弱（图1b），其蛋白相对表达水平显著性降低（*t*=11.88，*P*=0.0003）（图1c）。以上结果显示，慢病毒干扰PKM2能够下调K562细胞中PKM2的基因和蛋白水平，以上结果表明成功建立了下调PKM2的稳定细胞株K562。

chinaXiv:201811.00118v1

chinaXiv:201811.00118v1

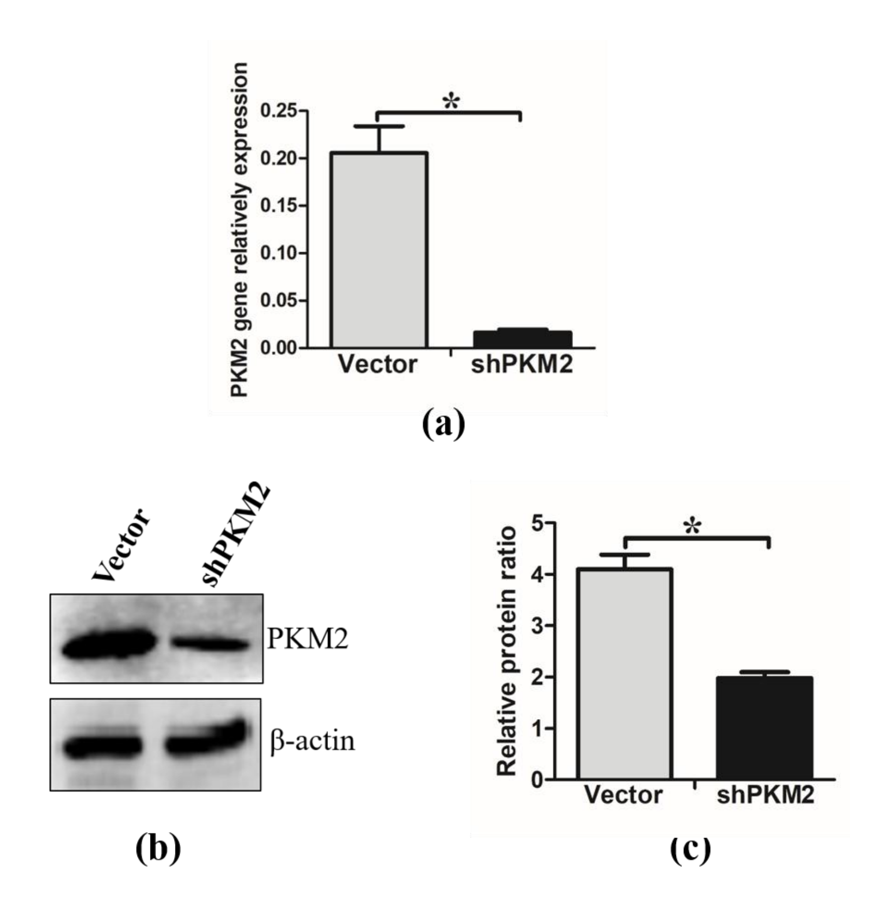


图1 慢病毒干扰PKM2对K562细胞PKM2 mRNA和蛋白表达水平的影响

Fig. 1 Effect of PKM2 shRNA transfecting on the levels of PKM2 mRNA and protein in K562 cells

(a) K562 cells were infected with shRNA lentivirus targeting *PKM2* and its Vector control, qRT-PCR was performed to analyze *PKM2* mRNA levels, normalized to *β-actin* (b) Western blot was performed to measure PKM2 protein levels, normalized to β-actin (c) The relative protein levels of PKM2. Vector means shRNA vector control group, shPKM2 means PKM2 knockdown lentivirus group. *P<0.05, compared with the Vector group.

2.2 干扰 PKM2 对 K562 细胞体外增殖的影响

采用 CCK-8 法检测干扰 PKM2 后 K562 细胞的体外增殖情况，结果显示，体外培养 12 h、24 h、36 h、48h 和 60 h 时，shPKM2 组 OD_{450} 值较 Vector 组 OD_{450} 值显著降低，差异具有统计学意义（F=118.87，P＜0.0001）（图 2），表明干扰 PKM2 能够抑制 K562 细胞的体外增殖能力。

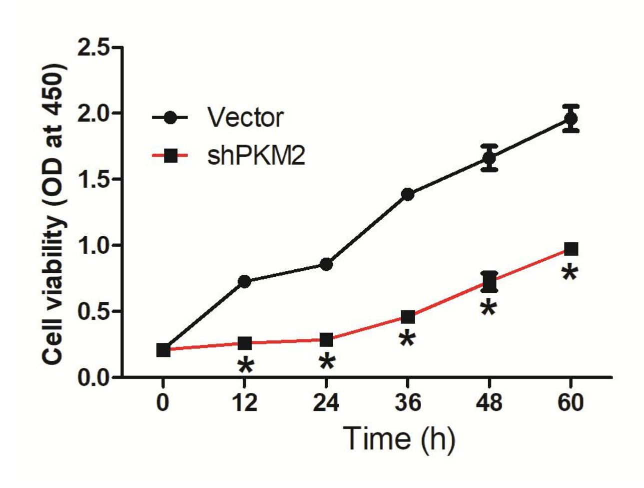


图 2 干扰 PKM2 对 K562 细胞体外增殖的影响

Fig. 2 Effect of PKM2 knockdown on proliferation of K562 cells *in vitro*. **P*<0.05, compared with the Vector group.

chinaXiv:201811.00118v1

2.3 干扰 PKM2 对 K562 细胞周期的影响

用FCM测定干扰PKM2后K562细胞的周期分布情况，结果显示（图3），shPKM2组中G_1期细胞所占比例（44.59±0.15）明显高于Vector组（28.14±1.65）(P<0.05)，G_2期细胞所占百分比（17.15±0.76）高于Vector组（3.31±0.30）(P<0.05)，而S期细胞所占百分比（38.26±0.62）低于Vector组（68.56±1.95）（P<0.05）(表2)。以上结果表明下调PKM2促使K562细胞周期进程大多滞留在G_1期。

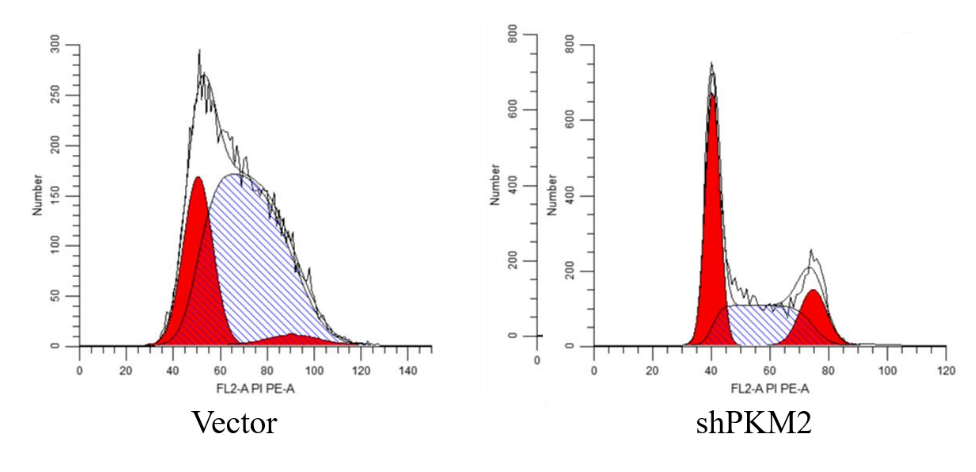


图3 流式细胞术检测干扰PKM2对K562细胞周期的影响

Fig. 3 Effects of PKM2 knockdown on cell cycle in K562 cells by FCM

表 2. 干扰 PKM2 对 K562 细胞周期分布的影响

Table 2. Effects of PKM2 knockdown on cell cycle distribution

Group	G_1(%)	G_2(%)	S(%)

Vector	28.14±1.65	3.31±0.30	68.56±1.95
shPKM2	44.59±0.15*	17.15±0.76*	38.26±0.62*

*P<0.05， compared with the Vector group.

2.4 干扰 PKM2 对 K562 细胞凋亡的影响

干扰PKM2对K562细胞凋亡影响的结果显示，与Vector组比较，shPKM2组的细胞凋亡率明显增加（图4a，图4b， t=37.23，P<0.0001）。此外，对凋亡相关蛋白Bax和Bcl-2表达水平的分析结果也显示，与Vector组相比，shPKM2组细胞中促凋亡蛋白Bax水平明显增加，而抗凋亡蛋白Bcl-2水平明显降低(图4c)。蛋白条带量化结果显示，shPKM2组Bax蛋白相对水平较Vector组显著升高（t=15.36，P=0.0001），而Bcl-2蛋白相对水平较Vector组显著降低，均具有统计学差异（图4d，t=9.965，P=0.0006）。上述结果提示，干扰PKM2能够促进K562细胞的凋亡，上调促凋亡蛋白Bax而下调抗凋亡蛋白Bcl-2的表达。

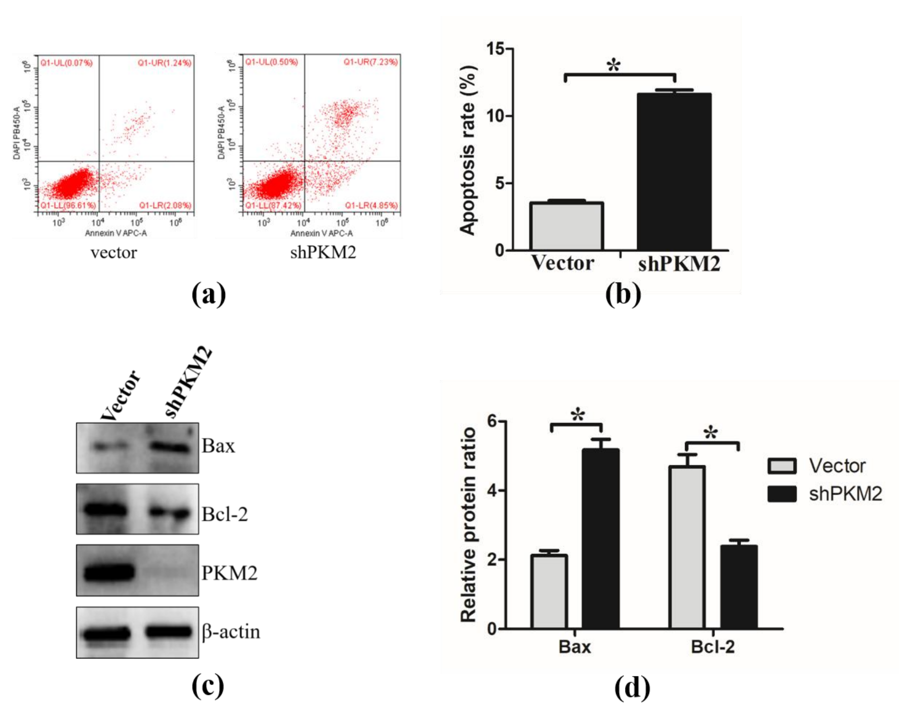


图 4 干扰 PKM2 对 K562 细胞凋亡的影响

Fig. 4 Effect of PKM2 knockdown on the apoptosis of K562 cells

(a) The apoptosis of K562 cells by FCM (b) The apoptosis rate of K562 cells. (c) Western blot was performed to measure Bax and Bcl-2 protein levels. (d) The relative protein levels of Bax and Bcl-2. Vector means shRNA vector control group, shPKM2

chinaXiv:201811.00118v1

means PKM2 knockdown lentivirus group. *P<0.05, compared with the Vector group.

2.5 干扰 PKM2 对 K562 细胞自噬活性的影响

鉴于自噬在肿瘤细胞生长中的调控作用[6]，通过检测自噬标志物（LC3II、p62）表达水平的改变可观察干扰 PKM2 对白血病细胞自噬活性的影响。qRT-PCR 结果显示，与 Vector 组相比，shPKM2 组 LC3II 基因水平显著性降低（t=4.219，P=0.0135），而 p62 较 Vector 组显著性升高（t=6.301，P=0.0032）（图 5a）。同时 Western blot 结果也显示，shPKM2 组 LC3II 蛋白表达降低，而 p62 蛋白升高（图 5b）。此外，蛋白条带量化结果显示，shPKM2 组 LC3II 相对水平显著降低，p62 相对水平显著升高，差异具有统计学意义（t_{LC3II}=10.32，P_{LC3II}=0.0005；t_{p62}=14.59，P_{p62}=0.0001）（图 5c）。以上结果表明干扰 PKM2 可抑制白血病细胞的自噬活性。

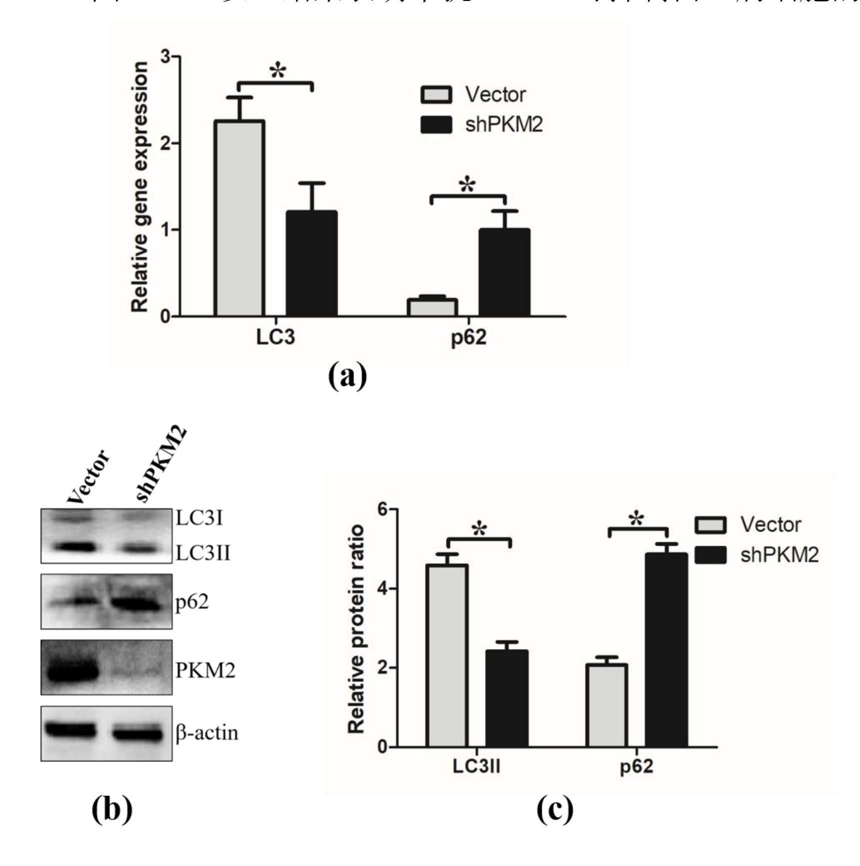


图 5 干扰 PKM2 对 K562 细胞自噬活性的影响

Fig. 5 Effect of PKM2 knockdown on the autophagic activity in K562 cells

(a) qRT-PCR was performed to analyze *LC3*、*p62* mRNA levels. (b) Western blot was performed to measure LC3、p62 protein levels. (c) The relative protein levels of LC3II、p62. Vector means shRNA vector control group, shPKM2 means PKM2 knockdown lentivirus group. *P<0.05, compared with the Vector group.

chinaXiv:201811.00118v1

chinaXiv:201811.00118v1

2.6 干扰 PKM2 联合自噬诱导剂对 K562 细胞增殖的影响

为进一步验证自噬在 PKM2 介导的细胞增殖中的作用，采用自噬诱导剂处理干扰 PKM2 表达后的 K562 细胞，观察细胞体外增殖能力的改变。CCK-8 结果表明，与 Vector 组比较，shPKM2 组细胞增殖能力明显降低；而与 shPKM2 组比较，用自噬诱导剂 rapamycin 处理组细胞增殖能力明显升高，差异具有统计学意义（图 6, F=96.32，P＜0.0001）。以上结果表明自噬诱导剂可逆转 PKM2 下调引起的细胞增殖受抑。

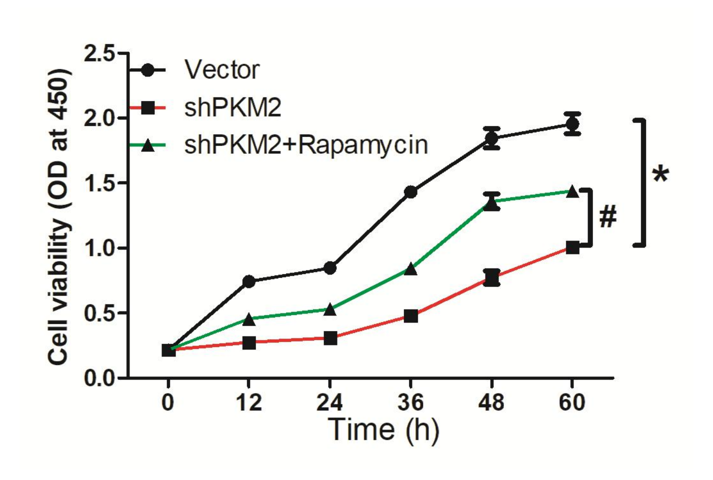


图 6 干扰 PKM2 联合自噬诱导剂对 K562 细胞增殖的影响

Fig. 6 Effects of PKM2 knockdown combined with autophagy activator on the proliferation of K562 cells *in vitro*. *P<0.05, compared with the Vector group; # P<0.05, compared with the shPKM2+Rapamycin group.

3 讨论

PKM2 是细胞糖酵解途径的关键酶，目前 PKM2 在肿瘤的研究多集中在实体肿瘤中[7]。最近有文献报道 PKM2 在血液系统肿瘤中的研究，Wang 等[8]发现 PKM2 高表达于白血病细胞系和正常造血干细胞中。Panchabhai 等[9]还发现多发性骨髓瘤患者中 PKM2 的高表达预示较差的临床预后。本实验主要观察 PKM2 对人白血病细胞株 K562 体外增殖和凋亡的影响及其潜在机制。首先应用 RNA 干扰技术成功建立 PKM2 稳定下调的人白血病 K562 细胞株。Lin 等[10]同样通过靶向 PKM2 的慢病毒干扰载体成功构建了稳定下调 PKM2 的子宫颈癌细胞株（HeLa，SiHa 细胞株等）。继后细胞增殖实验结果显示，干扰 PKM2 能显著降低 K562 白血病细胞的体外增殖能力。Goldberg 等[11]发现下调 PKM2 的表达能降低肝细胞肿瘤和卵巢癌细胞生存。已知细胞增殖的调控可通过影响细胞周期进程来实现，据此观察了干扰

chinaXiv:201811.00118v1

PKM2 对 K562 细胞周期进程的影响，结果显示干扰 PKM2 组 K562 细胞大多滞留在 G_1 期，K562 细胞增殖受到抑制。Zheng 等[12]发现 PKM2 高表达能够上调周期蛋白 CCND1 的表达和下调 CDKN1A 的表达，促进细胞周期进程，进而增强卵巢癌细胞的生长和存活。此外，还观察了干扰 PKM2 对白血病细胞凋亡的影响，结果表明干扰 PKM2 可使 K562 细胞的凋亡率显著增加，同时伴有促凋亡蛋白 Bax 表达增加而抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达减少，反向提示 PKM2 可能通过促进白血病细胞增殖和抑制凋亡来发挥促癌作用。自噬又被称为细胞的“自我消化（self-digestion）”[13]，随着自噬分子调控机制的研究揭示，自噬在血液恶性疾病中的作用日益得到重视。为此，本实验观察干扰 PKM2 对 K562 细胞中 LC3II 和 p62 表达的影响。结果发现，干扰 PKM2 后 K562 细胞中 LC3II 水平降低，而 p62 水平增加，提示干扰 PKM2 可能降低白血病细胞的自噬活性。为进一步验证自噬在介导白血病细胞体外增殖中的重要作用，设计了 rescue 实验，结果发现，尽管干扰 PKM2 能够抑制白血病细胞的生长，若采用自噬诱导剂 rapamycin 处理则能够逆转 PKM2 下调引起的细胞增殖受抑。Polak 等[14]报道用自噬抑制剂羟化氯喹处理急性淋巴细胞白血病细胞，可抑制自噬活性而降低白血病细胞的增殖能力。最近，Piya 等[15]研究发现骨髓间充质细胞可诱导白血病细胞自噬活性，导致白血病细胞对阿糖胞苷和依达卢比星等化疗药物的抵抗。若沉默自噬相关基因 ATG7 则能提高白血病细胞对化疗药物的敏感性。本实验结果和以往的研究均提示靶向 PKM2 联合自噬抑制剂可能作为白血病治疗的潜在靶点。然而，有关 PKM2 调控自噬的具体机制将是本课题组下一步研究的重点。

4 结论

综上所述，干扰PKM2能够抑制人白血病K562细胞体外增殖、使细胞周期阻滞在G_1期，并且能够诱导细胞凋亡。其作用机制可能与PKM2介导的自噬活性降低有关。下一步本组将在动物模型和临床样本中观察PKM2对白血病发生发展的重要作用。深入研究PKM2的作用机制有可能为白血病的诊治提供一个新的靶点。

参考文献(References)

[1] Pfrepper C, Klink A, Behre G, et al. Risk factors for outcome in refractory acute myeloid leukemia patients treated with a combination of fludarabine, cytarabine, and amsacrine followed by a reduced-intensity conditioning and allogeneic stem cell transplantation. J Cancer Res Clin Oncol, 2016, 142(1): 317-324.

[2] Jang M, Kim S S, Lee J. Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets. Exp Mol Med, 2013, 45: e45.

[3] Dayton T L, Jacks T, Vander Heiden M G. PKM2, cancer metabolism, and the road ahead. EMBO Rep, 2016, 17(12): 1721-1730.

[4] Yang W, Lu Z. Pyruvate kinase M2 at a glance. J Cell Sci, 2015, 128(9): 1655-1660.

[5] Orsini M, Morceau F, Dicato M, et al. Autophagy as a pharmacological target in hematopoiesis and hematological disorders. Biochem Pharmacol, 2018, 152: 347-361.

[6] Takahashi H, Inoue J, Sakaguchi K, et al. Autophagy is required for cell survival under L-asparaginase-induced metabolic stress in acute lymphoblastic leukemia cells. Oncogene, 2017, 36(30): 4267-4276.

[7] Cheng T Y, Yang Y C, Wang H P, et al. Pyruvate kinase M2 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma invasion and metastasis through phosphorylation and stabilization of PAK2 protein. Oncogene, 2018, 37(13): 1730-1742.

[8] Wang Y H, Israelsen W J, Lee D, et al. Cell-state-specific metabolic dependency in hematopoiesis and leukemogenesis. Cell, 2014, 158(6): 1309-1323.

[9] Panchabhai S, Schlam I, Sebastian S, et al. PKM2 and other key regulators of Warburg effect positively correlate with CD147 (EMMPRIN) gene expression and predict survival in multiple myeloma. Leukemia, 2017, 31(4): 991-994.

[10] Lin Y, Meng F, Lu Z, et al. Knockdown of PKM2 suppresses tumor progression in human cervical cancer by modulating epithelial-mesenchymal transition via Wnt/beta-catenin signaling. Cancer Manag Res, 2018, 10: 4191-4202.

[11] Goldberg M S, Sharp P A. Pyruvate kinase M2-specific siRNA induces apoptosis and tumor regression. J Exp Med, 2012, 209(2): 217-224.

[12] Zheng B, Liu F, Zeng L, et al. Overexpression of Pyruvate Kinase Type M2 (PKM2) Promotes Ovarian Cancer Cell Growth and Survival Via Regulation of Cell Cycle Progression Related with Upregulated CCND1 and Downregulated CDKN1A Expression. Med Sci Monit, 2018, 24: 3103-3112.

[13] Tooze S A, Dikic I. Autophagy Captures the Nobel Prize. Cell, 2016, 167(6):

chinaXiv:201811.00118v1

1433-1435.

[14] Polak R, Bierings M B, van der Leije C S, et al. Autophagy inhibition as a potential future targeted therapy for ETV6-RUNX1 driven B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Haematologica, 2018.

[15] Piya S, Andreeff M, Borthakur G. Targeting autophagy to overcome chemoresistance in acute myleogenous leukemia. Autophagy, 2017, 13(1): 214-215.

chinaXiv:201811.00118v1